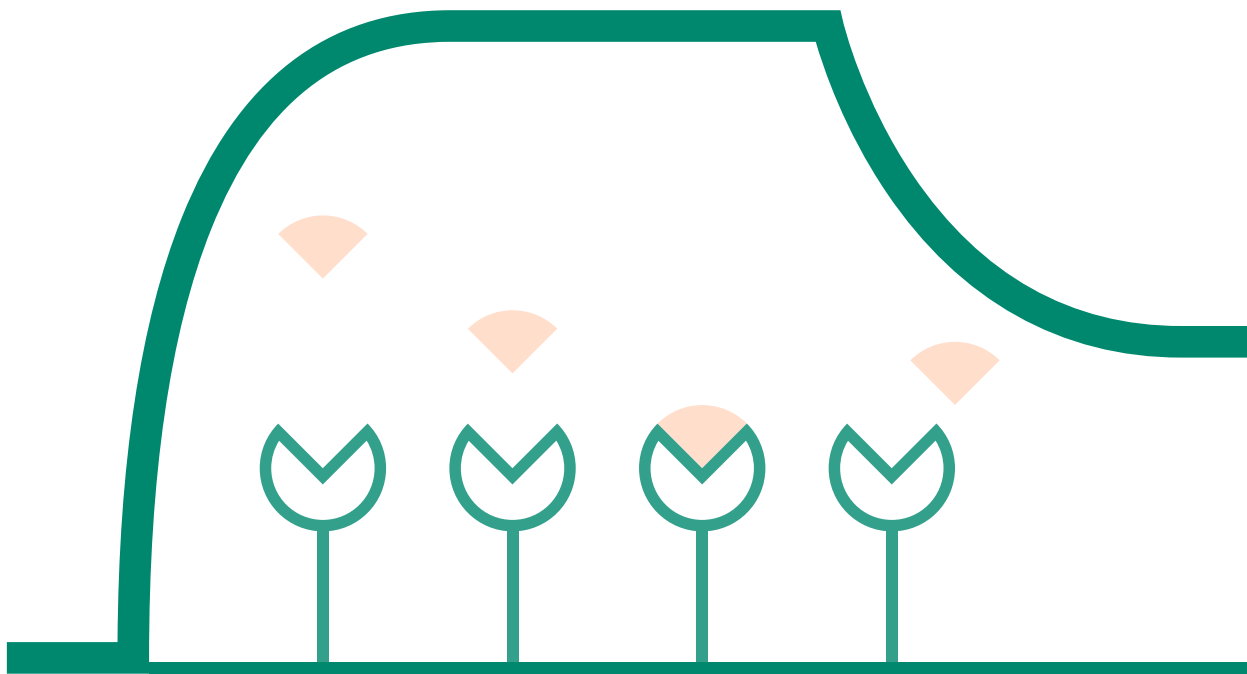


Biacore 检测抗体与 FcγR II a 相互作用 操作指南



目录

一、实验目的	3
二、注 释	3
三、实验使用机型、试剂和耗材	3
四、实验步骤	3
(一) 仪器准备	3
(二) 捕获芯片制备	6
(三) 样品检测过程	8
(四) 实验结果分析	15

实验目的

利用 Biacore T200 检测抗体与 FcγR II a 结合的亲和力数据 KD。本实验利用 CM5 芯片偶联 anti-his 抗体 (或使用 NTA 芯片 + NTA reagent kit, 具体操作参考《Biacore 捕获法检测抗体与 FcRn 相互作用操作指南》), 捕获带 his-tag 的 FcγR II a, 抗体作为分析物检测亲和力。也可使用 Protein A/G 芯片 (Protein A 芯片货号: 29-1275-55, Protein G 芯片货号: 29-1793-15) 或 CM5 + human antibody capture kit (货号: 29234600) 通过捕获法捕获抗体, FcγR II a 作为流动相进行检测, 具体操作可参考《Biacore 捕获法检测抗体与抗原相互作用操作指南》。若 FcγR II a 所带 tag 为 biotin, 也可用 SA 芯片 (货号: BR-1003-98) 或选择 Biotin CAPture Kit, Series S (货号: 28-9202-34) 来进行检测, 具体操作可参考《Biacore 检测蛋白与核酸相互作用操作指南》。

注释

注意事项: 实验前请详细阅读该指南, 并准备好相应实验用品。该指南仅供类似实验参考, 用户须根据实际样品来源、条件、目的调整各项实验参数。

实验使用机型、试剂和耗材

- 本实验所用的机型: Biacore T200, 若为其他机型, 请按照对应机型的操作说明进行调整, 或咨询 Biacore 产品专家。
- S 系列 CM5 芯片。CM5 芯片货号: 29-1049-88 (一片装), BR-1005-30 (三片装), 29-1496-03 (十片装), 厂家为 Cytiva。
- 氨基偶联试剂盒 (货号: BR-1000-50), 厂家为 Cytiva。
- His 捕获试剂盒 (货号: 28-9950-56), 包含 50 μL 1mg/mL anti-his antibody, 1.2 mL Acetate 4.5, 100 mL Glycine 1.5, 厂家为 Cytiva。
- 缓冲液: 10 x HBS-EP+ (货号: BR-1006-69), 厂家为 Cytiva。(也可扫描右侧的二维码选择含上述所有耗材的套餐)
- 去离子水 (0.22 μm 膜过滤, 若纯水仪已含该滤芯, 可无需再次过滤直接使用)。
- 无盖 1.5 mL EP 管 (货号: BR-1002-87), 厂家为 Cytiva。
- 带 His-tag 的 FcγR II a, 用去离子水溶解稀释至 0.5 μg/mL。



实验步骤

仪器准备



开机操作

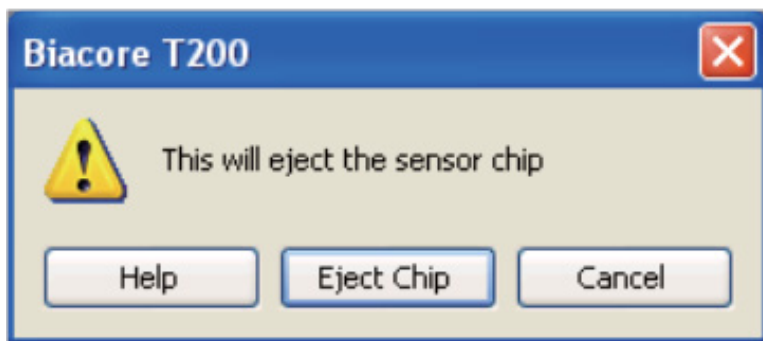
- 打开 Biacore T200 系统和电脑电源开关。Biacore T200 的电源开关位于系统背面的右下角。开机自检通过后 (无红灯, 温度指示灯闪烁为正常, 待系统温度达到设定温度后, 面板上的温度指示灯会停止闪烁), 即可操作。
- 打开 Biacore T200 控制软件 (Biacore T200 control software), 运行后软件会自动和主机系统建立连接。
- 准备运行缓冲液。量取 50mL 10 x HBS-EP+ buffer、450mL 去离子水 (已经 0.22 μm 膜过滤), 混匀后放入 500 mL 缓冲液瓶。
- 设备开机后, 即可使用, 无需等待。

缓冲液的放置

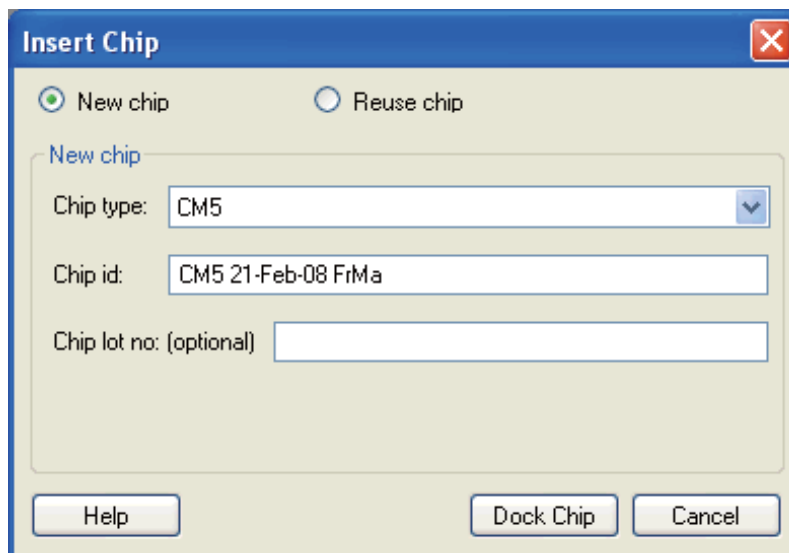
- 将已经配制好的缓冲液放在 Biacore T200 系统左侧的托盘上。
- 将缓冲液进液管 A（注意软管上的蓝色标签）插入至缓冲液瓶底部。其余三根进液管（B、C 和 D）不要动。
- 将 2L 的废液瓶放置在 Biacore T200 系统右侧的托盘上，并拧上专用的盖子。
- 取 500mL 去离子水装入 500mL 瓶中，放置在右侧托盘上，并将标有 water 标签的管子插入瓶中，用于清洗进样针。

芯片的放置

- 点击工具条中的  按钮或选择 Tools 菜单中的 Insert Chip 选项，打开芯片舱门。
- 如果已经有芯片在芯片舱内，点击工具条中的  按钮或选择 Tools 菜单中的 Eject Chip 选项。（若芯片舱中没有芯片，此步直接跳过）



- 如果使用的是新芯片，选择 New Chip。在 Chip Type 的下拉菜单中选择对应的芯片种类（此实验为 CM5 芯片），在 Chip Id 中填入和芯片相关的实验信息，Chip lot No. 中可填入芯片批号（选填）。如果是已经使用过的芯片，请选择 Reuse Chip，并在 Chip Id 下拉菜单中找到与之相对应的芯片信息。



- 手持芯片, 有字的一面朝上。按照芯片上的箭头方向, 将芯片轻轻推入卡槽, 最后合上芯片舱的舱门。



- 点击 Dock Chip 按钮, 芯片置入后系统将自动转入待机 (Standby) 状态。
- 选择 Tools → Prime 命令, 点击 Start。缓冲液会以较高的流速冲洗整个内部的流路系统, 整个过程耗时 6-7 分钟。结束后, 点击 Close, 系统自动转入待机 (Standby) 状态。注意: 当系统开机或更换缓冲液后, 必须运行 Prime 程序。Prime 时缓冲液会冲洗整个流路系统, 为下一步的实验做好准备。

放置样品架

- Biacore T200 有三种不同的样品架供用户使用: Reagent Rack 1、Reagent Rack 2 (图 A) 和 Sample and Reagent Rack1 (图 B), 见下图。

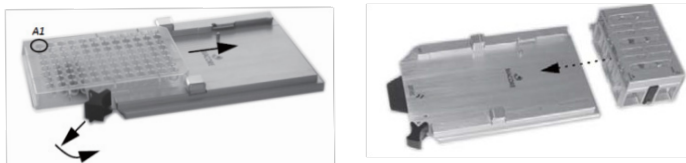


图 A: Reagent Rack 1&2 (左 1 右 2)




图 B: Sample and Reagent Rack1

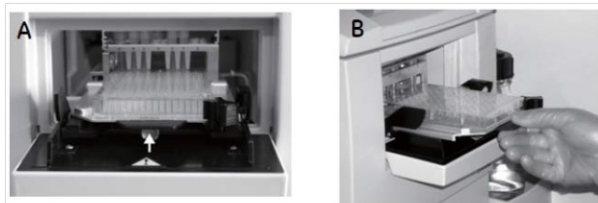
Reagent Rack 1&2 通常和 96/384 微孔板配合使用, 加装在指定的样品架底座上。具体的组装方式参见下图。



Reagent Rack 1&2 和 96/384 微孔板安装方式

本次实验中使用 Sample and Reagent Rack1。(若待测样品数量多, 可选择 Reagent Rack 1 或 2, 并需要根据需要选择是否加 96/384 孔板)。

- 点击工具栏  按钮, 或选择 Tool → Eject Rack, 样品舱舱门会自动打开。
- 用手指将样品架底座下方的金属按键向里按 (见下图中白色箭头), 样品架将会解除锁定并弹出, 然后可以轻轻抽出样品架。



样品架的取出方式

- 按住样品架右侧的黑色按钮，金属盖会自动弹开。放入相应的样品后，轻轻合上金属盖。听到“咔哒”声，表明金属盖已经处于锁定状态。
- 将样品架沿着卡槽轻轻推入样品舱，听到“咔哒”声，表明样品架已经处于正确位置并锁定。



样品架的放入方式

- 点击 Eject Rack Tray 对话框中的 OK，样品架会被自动送入样品舱，舱门也会自动关上。注意：样品舱舱门打开后会有时间限制，打开 60-90 秒后舱门将自动关上。最后 15 秒时，对话框中的倒计时时会显示为红色字体并闪烁。此时请不要强行将样品架放入，以免夹到手。可以等待舱门合上后，重新打开即可。

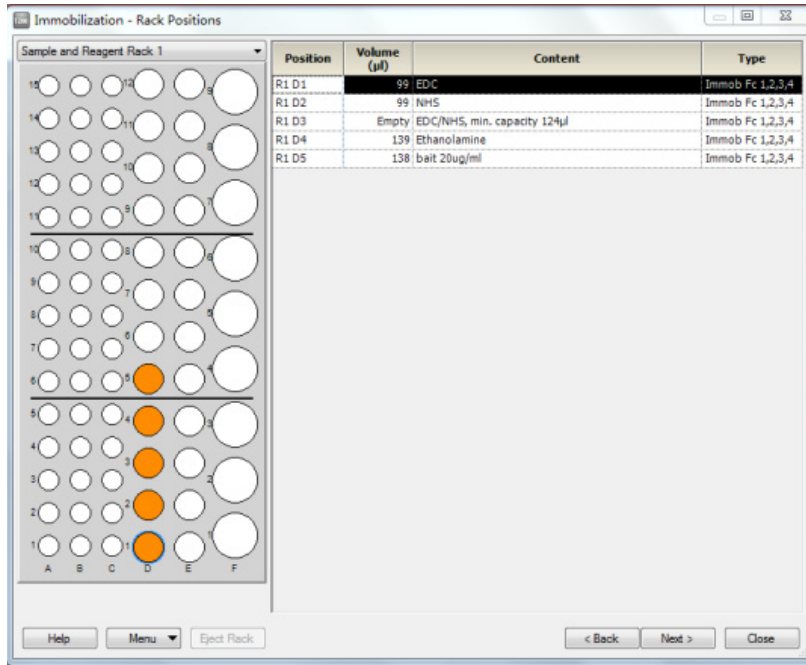
捕获芯片制备

1、偶联缓冲液：1×HBS-EP+。

2、Anti-his antibody 偶联（具体操作参考 His capture kit 说明书）

1) 打开 Biacore T200 Control Software, 点击 File 下面的 Open/New wizard template, 选择 immobilization。对话框中，Chip type 选 CM5，在 Flow cells per cycle 选 2。勾选 Flow cell 1,2（如 1,2 已用，可选择 3,4），method 选用 amine 氨基偶联，ligand 输入 anti-his antibody，选用 Specify contact time and flow rate，contact time 为 420s。接着点 Next，选择实验温度，一般默认 25°C。

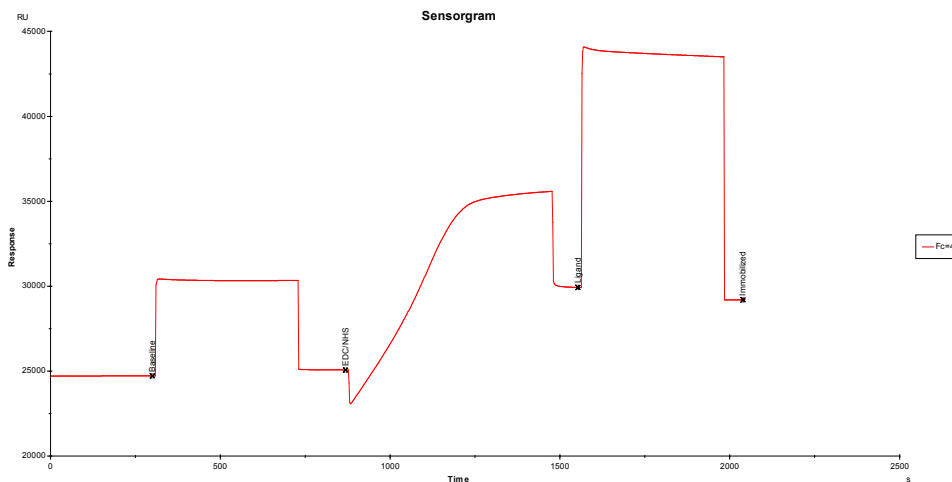
2) 在左侧下拉菜单中选用 Sample and Reagent Rack 1，在 Menu 里选 Automatic Positioning 自动排放样品位置或自行通过鼠标拖拽安排。根据屏幕显示，准备相应的样品，放入的样品体积略大于显示的体积即可，其中 anti-his antibody 用 pH4.5 的醋酸钠稀释至 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。然后，再按要求将不同样品放入样品架指定位置，如果使用的是带盖的 EP 管，所有盖子必须剪去。盖上样品架金属盖子，将样品架送回样品舱。



3) 点击 Next，弹出 Prepare Run Protocol 对话框，确认各项均符合要求后，点击 start。保存 method 与 result 文件到文件夹（可默认或自行指定，注意本指南中所有要保存的指定文件夹与文件名不可有中文字符）。系统正式自动运行偶联程序。

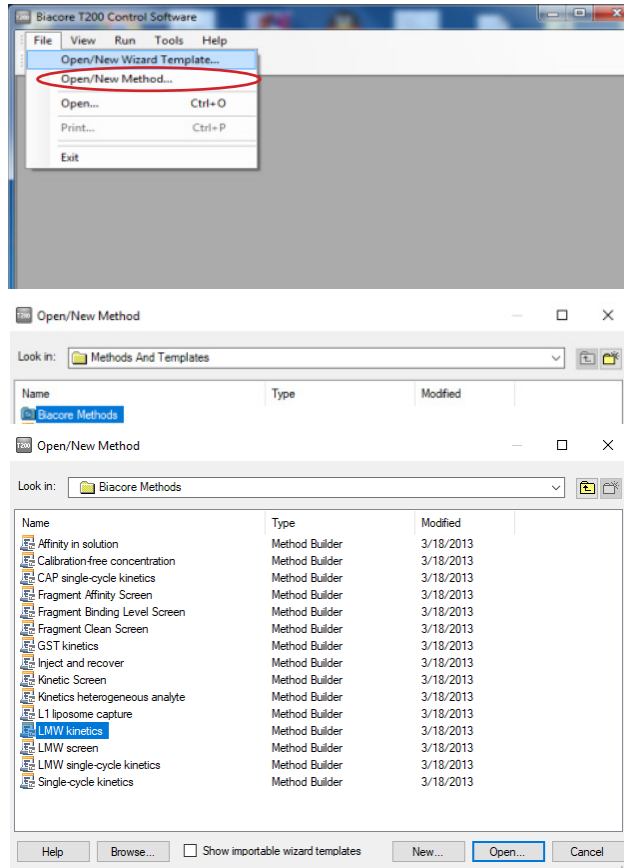
4) 偶联结束后，软件自动生成并显示偶联结果。本次实验 fc1 和 fc2 偶联量为 11000RU 左右（具体偶联量视样品实际情况略有差异，在 7000-14000RU 之间即可）。

5) 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。

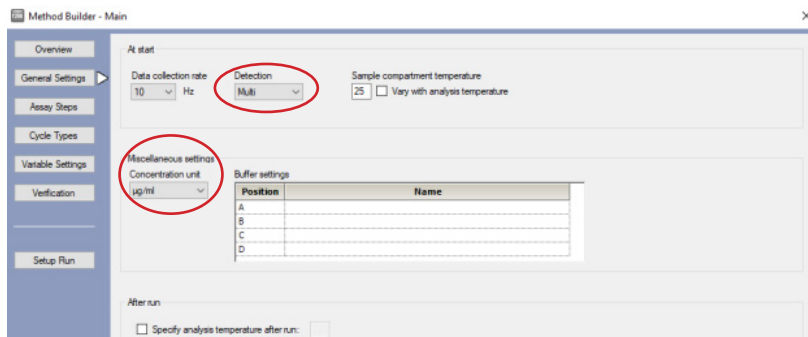


样品检测过程

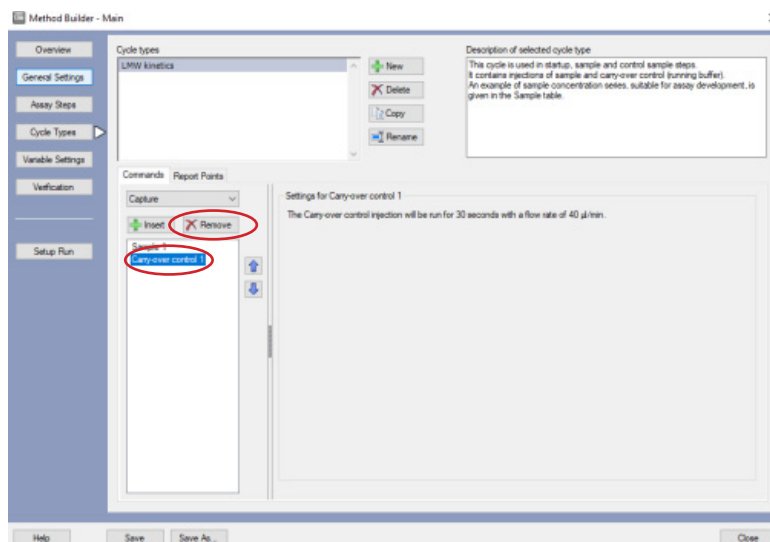
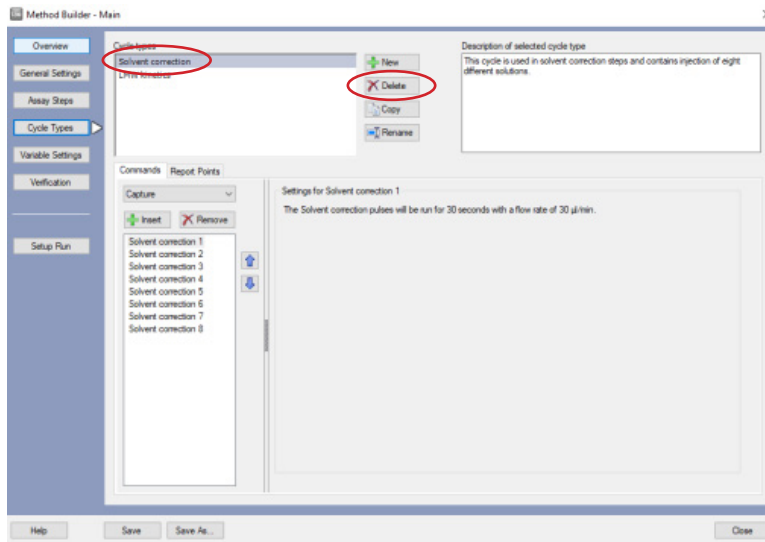
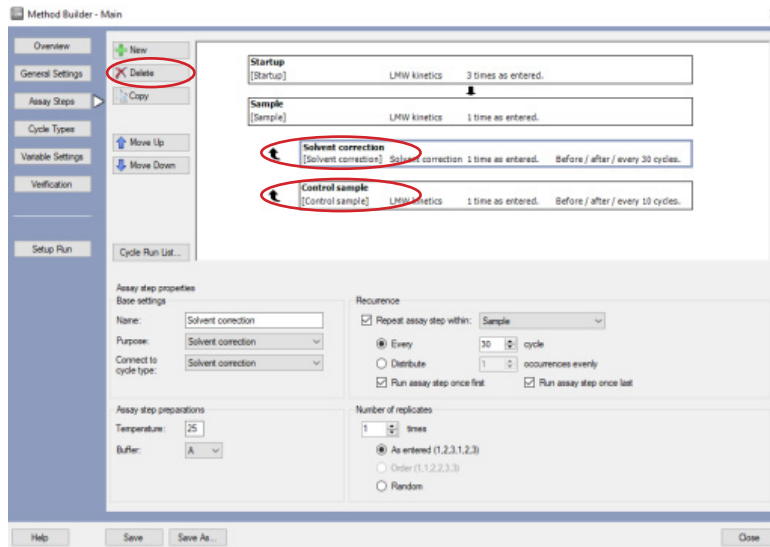
- 在打开的 Biacore T200 Control Software 里点开 file 中的 Open/New Method，然后双击打开 Biacore Methods，双击 LMW kinetics。（若只捕获 FcγRIIa，可改用 Wizard，具体的操作参考 Biacore 检测抗体与 FcγRIIb 相互作用操作指南）



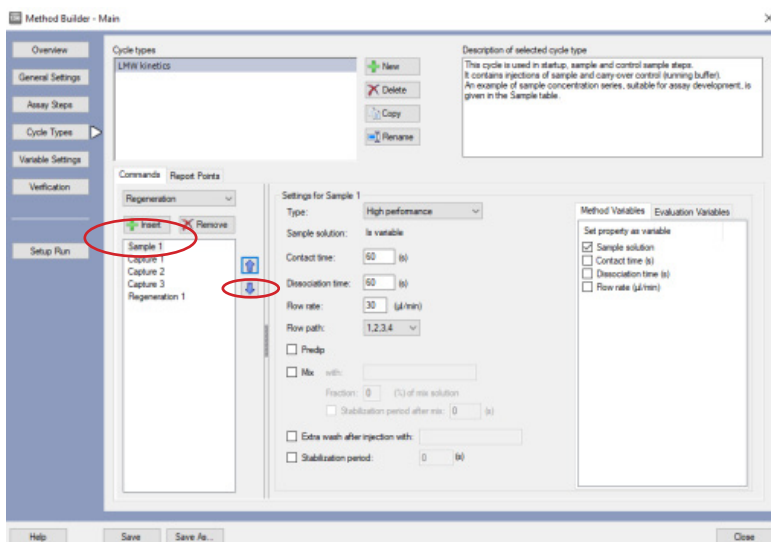
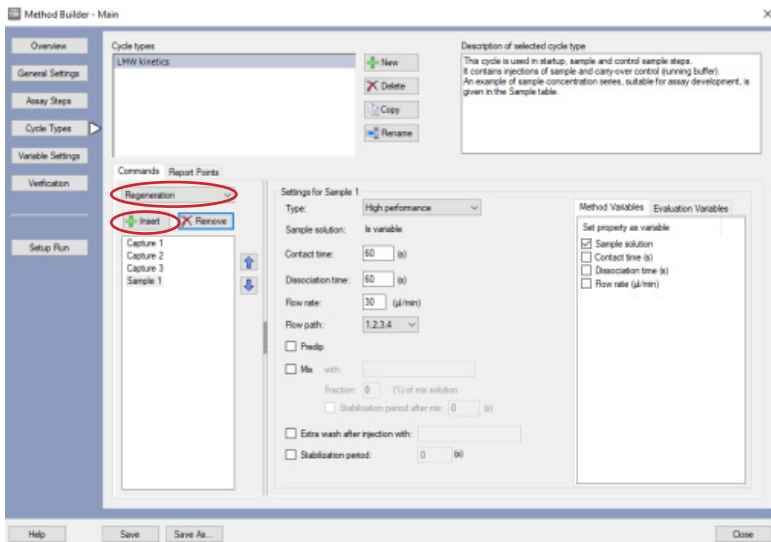
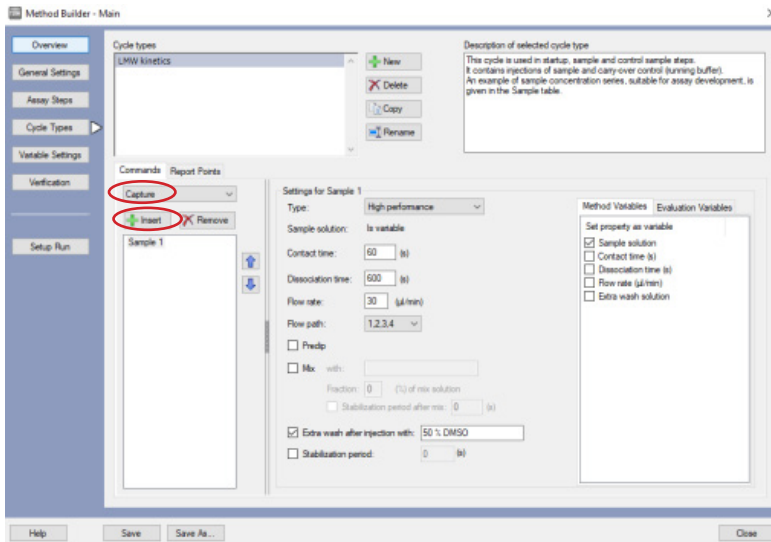
- 在 General Settings 界面，可以修改数据采集频率、检测 Flow cell 数目、分析物浓度单位、样品仓温度等条件，在此我们将 Concentration unit 改为 $\mu\text{g/mL}$ ，若要同时检测不同的 FcγR（3 个）与抗体的互动，Detection 下面可以选 Multi，后面在 setup Run 时选择检测的 Flow path 为 2-1,3-1,4-1。

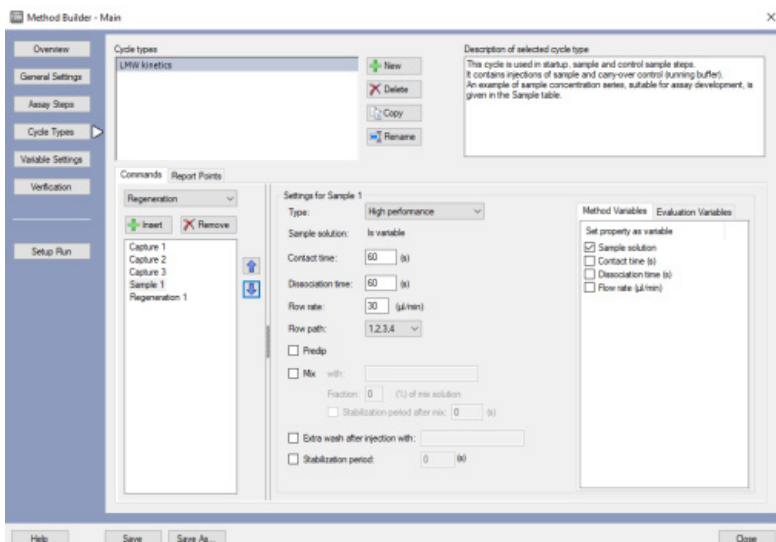


- 在 Assay Steps 界面，分别选择 control sample 和 Solvent correction，点击 Delete 将其删除。在 Cycle Types 界面，选择 Solvent correction，点击 Delete，将其删除；选择 Carry-over control 1，点击 Remove，将其删除。

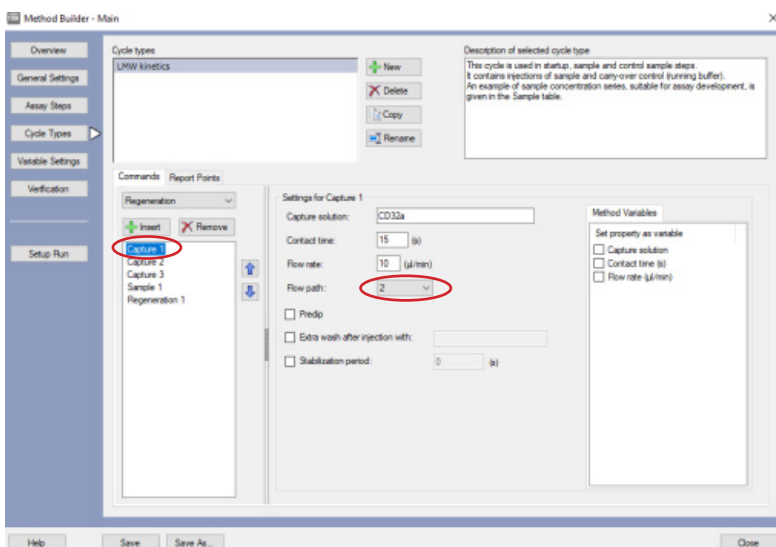


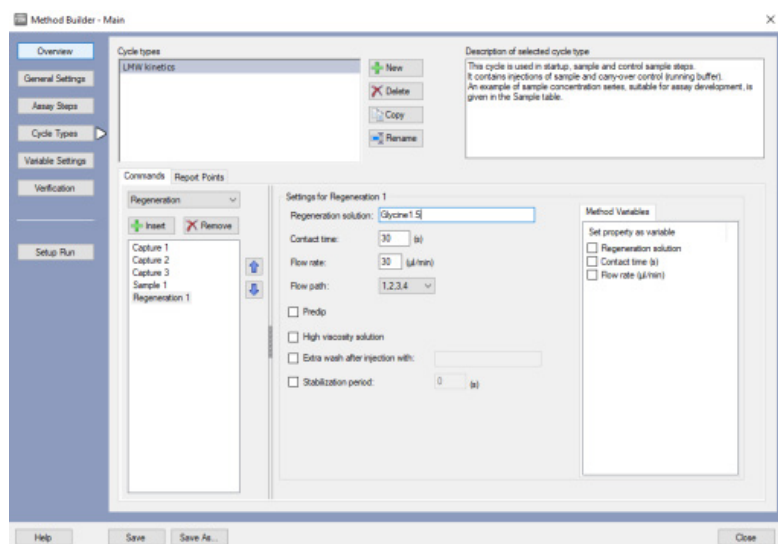
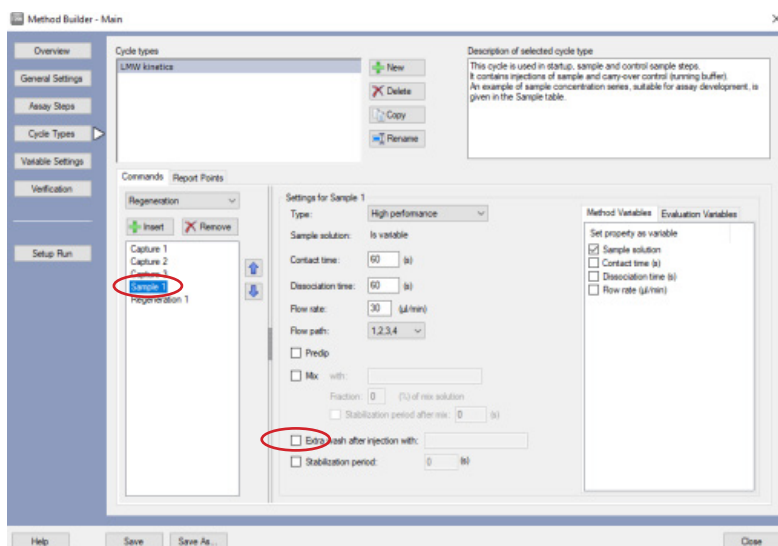
- 在 Cycle Types 界面，选择 Capture 命令，点击 3 次 Insert 添加捕获命令，选择 Regeneration，点击 Insert 添加再生命令；选择 Sample 1，点击 3 次向下箭头，将样品分析步骤放置在三次不同通道捕获之后、再生之前。



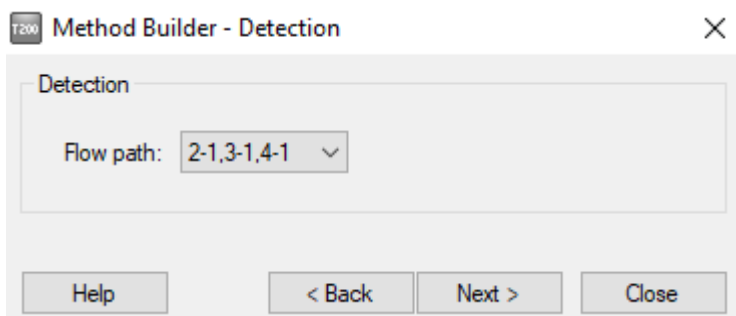


- 在 Cycle Types 界面，点击下方 Capture 1，在其右侧可以修改捕获配体名称、结合时间、流速、流路等进样参数。Capture solution 填写 CD32a，contact time 为 15s（具体时间视样品活性进行调整，以达到捕获量为准。捕获量通常在 35 RU 左右，若样品活性不高，可增加捕获量），Flow rate 为 10 µl/min，Flow path 为 2。同理，点击下方 Capture 2，Capture solution 填写 CD32b，contact time 为 15s（具体时间视样品活性进行调整，以达到捕获量为准。捕获量通常在 45 RU 左右，若样品活性不高，可增加捕获量），Flow rate 为 10 µl/min，Flow path 为 3。同理，Capture solution 填写 CD16b，contact time 为 30s（具体时间视样品活性进行调整，以达到捕获量为准。捕获量通常在 55 RU 左右，若样品活性不高，可增加捕获量）。在 Sample 1 一栏中，Contact time 为 60s，Flow rate 为 30 µl/min，Dissociation time 为 60s，并将 Extra wash 前的 去掉。在 Regeneration 一栏中，再生条件为 Glycine 1.5，再生时间 30s。





- 点击 Verification，如果方法有问题，在此页面会报错，并根据报错提示返回相应步骤进行修改。如果无问题，点击 setup Run。在 detection 界面将 Flow path 设为 2-1,3-1,4-1。



- 点击 Next, 进入分析物信息填写。Startup 中 Sample solution 填写 HBS-EP+, Sample 中 Sample solution 填写样品名称, Conc 填写进样浓度 (样品浓度由低到高填写)。注意要设置重复浓度和零浓度。具体填写如下:

Method Builder - Variables

Assay steps

Startup

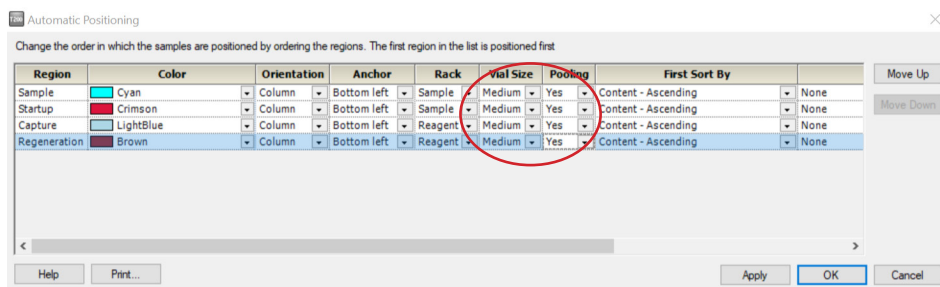
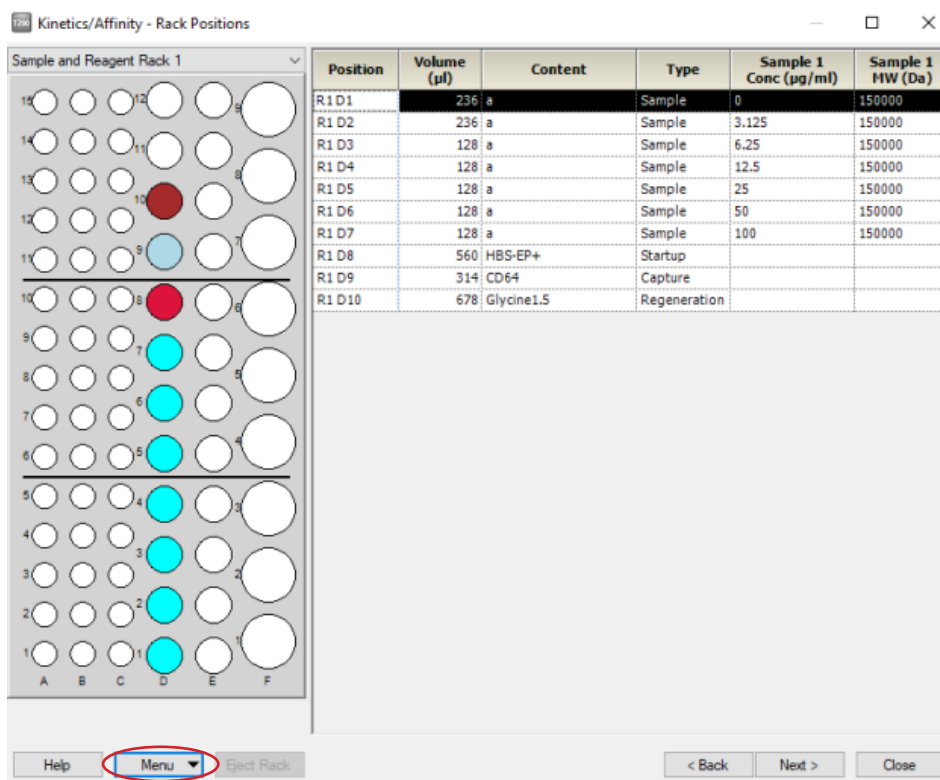
Sample

Variable values for Assay Step Sample

Sample 1			
	Sample solution	Conc (µg/ml)	MW (Da)
1	a	0	150000
2	a	15.625	150000
3	a	31.25	150000
4	a	62.5	150000
5	a	125	150000
6	a	250	150000
7	a	500	150000
8	a	1000	150000
9	a	0	150000
10	a	15.625	150000
*			


Help Import < Back Next > Close

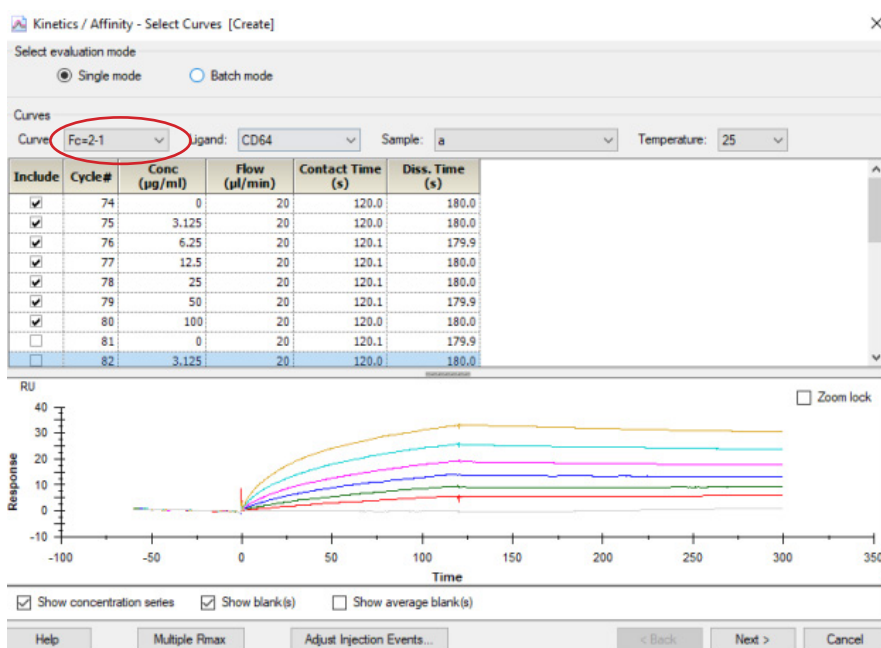
- 点击 3 次 Next，进入 Rack Positions 界面，将 Reagent Rack 改为 Sample and Reagent Rack1 (若需要用 96/384 孔板,则选择 Reagent Rack1 或 2,同时下方 96 well microplate 中选择对应的孔板类型)，点开 Menu 后选 Automatic Positioning，Vial size 选项选择 Medium，若要合并相同样品，pooling 选项选择 yes，点击 OK。



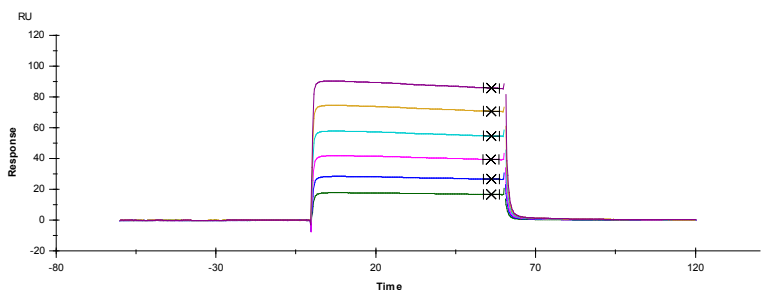
- 按照屏幕显示准备相应样品，并按指定位置放置。样品 a 用运行缓冲液 HBS-EP+ 进行倍比稀释。点击 Next，对方法进行保存，再对数据路径（可使用系统默认的，也可自行指定，注意所保存的文件名及指定文件夹名均不能有中文字符）进行保存，仪器便会开始自动运行。

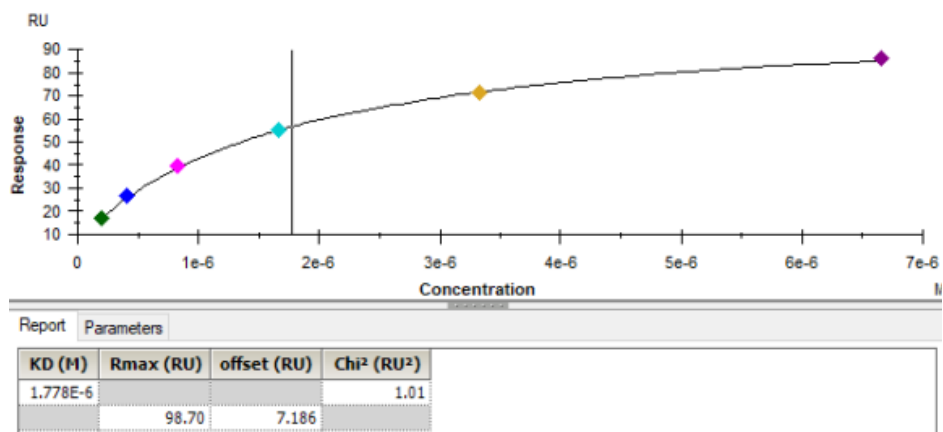
实验结果分析

- 打开 Biacore T200 Evaluation Software, 点击 , 找到保存的结果文件。点击左侧 Plot 中的 Binding to reference, 检查各个点是否趋于一致或小于 binding level 中对响应值的 20%, 再检查 binding level 各个点的响应值是否存在明显的浓度依赖。如是, 直接跳到下一步。注: 若 Binding to reference 各个点的响应值也存在浓度依赖且大于 binding level 中对响应值的 20%, 即存在非特异性结合。此时可尝试提高运行缓冲液中盐离子浓度或提高 P20 (货号: BR-1000-54) 浓度不超过 1%。若 baseline 中各个点的响应值上飘, 可适当延长再生溶液的进样时间。
- 点击上方中间位置的 Kinetics/Affinity, 在下拉栏里点击 Surface bound。在 Kinetics/Affinity-Select Curves 界面的 Select evaluation mode 下面选择 Single mode, (若为多组实验结果, 并想批量处理, 可选 batch mode; 或在 Single mode 模式下, Curve 选择 Fc = 2-1 或 3-1 或 4-1, 分别分析各对互作)。在跳出的窗口中选择合适的、至少 5 个连续浓度进行拟合。不需要的浓度, 可在样品浓度表格中将此浓度前的对号去掉即可。



- 点击右下角 Next, 选择右下角 Affinity (当传感图为“时间依赖的动力学特征”时, 选 Kinetics), 点击 Next, Model 选择 Steady State Affinity, 点击左上角 Fit 进行数据拟合, 点击右下角 Finish 完成。经拟合, 抗体 a 与 FcγR II a 结合的亲和力 $KD=1.778 \times 10^{-6}$ M。(对于亲和力拟合, KD 竖线最好落在样品浓度范围内, 并尽量小于最高浓度的一半位置。若 KD 竖线 > 最高浓度, 则可提高进样浓度梯度, 或在上一步选择更高浓度的、至少 5 个连续浓度的样品进行拟合。





- 将鼠标放在图上，点击右键可以直接 copy graph (small, medium, large) 用于文章发表，也可以右键点击 export curve，导出 txt 文本后自行用第三方软件作图。

如有问题，请拨打免费技术热线
请拨 400-810-9118

关于 Cytiva 思拓凡

Cytiva 思拓凡是全球生命科学领域的先行者，在全球 40 余个国家和地区拥有 8000 名员工，致力于推进未见技术，加速非凡疗法。作为客户可信赖的合作伙伴，Cytiva 专注于生命科学和生物技术研究，用以开发创新型疫苗、生物药物以及新型细胞和基因疗法。通过提升药物研发和生物工艺的速度、效率和能力，为惠及全球患者开发和生产变革性药物和疗法。

请访问 cytiva.com.cn 获取更多信息。

智荟专线：400 810 9118

官微订阅号：Cytiva

官微服务号：CytivaChina

cytiva.com.cn

Cytiva 和 Drop 标识是 Global Life Sciences IP Holdco LLC 或其附属公司的注册商标。Cytiva 版权所有商品和服务的销售需遵守在 Cytiva 企业中运营之供应商公司的销售条款与条件。可应要求提供这些条款与条件的副本。如需了解最新信息，请联系您当地的 Cytiva 代表。如需查看当地办公室的联系信息，请访问 cytiva.com.cn/contact。

CY00000-00Mar00-BR

